

AUTORES

AUTHORS

✉ **Giuliano DRAGONE**

Universidade do Minho
Departamento de Engenharia Biológica
Campus de Gualtar
CEP: 4710-057
Braga, Portugal
e-mail: gdragone@deb.uminho.pt

Solange Inês MUSSATTO

Universidade do Minho
Departamento de Engenharia Biológica
e-mail: solange@deb.uminho.pt

Alvaro Dertinate NOGUEIRA

Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI)
Centro de Tecnologia de Alimentos e Bebidas
e-mail: adnogueira@alimentos.senai.br

João Batista de ALMEIDA e SILVA

Universidade de São Paulo (USP)
Escola de Engenharia de Lorena
Departamento de Biotecnologia
e-mail: joabatista@debiq.eel.usp.br

RESUMO

A cerveja é uma bebida que apresenta características desfavoráveis para a multiplicação de vários microrganismos, sendo reconhecida como um produto de considerável estabilidade microbiológica. Porém, algumas espécies de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas (*Lactobacillus* e *Pediococcus*), Gram-negativas (*Pectinatus* e *Megasphaera*) e leveduras selvagens (*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*) são capazes de se multiplicar nesta bebida, conferindo características indesejáveis, tais como turbidez e mudanças sensoriais, as quais prejudicam a qualidade do produto final. Este fato tem motivado uma série de pesquisas visando ao desenvolvimento de métodos rápidos e específicos para a detecção dos microrganismos deteriorantes da cerveja. Apesar de a detecção desses microrganismos, por cultivo em meios de laboratório, nem sempre proporcionar a especificidade e sensibilidade requerida, o uso de diferentes meios seletivos e condições de incubação continua sendo o método preferido pelas cervejarias. O presente artigo apresenta uma revisão da literatura sobre os principais microrganismos deteriorantes da cerveja, incluindo as causas que favorecem sua multiplicação e os métodos que podem ser empregados para sua detecção.

SUMMARY

Beer is a beverage that presents unfavourable features for the growth of several microorganisms, being recognized as a product of considerable microbiological stability. However, some species of microorganisms, including Gram-positive (*Lactobacillus* and *Pediococcus*) and Gram-negative bacteria (*Pectinatus* and *Megasphaera*) and wild yeasts (*Saccharomyces* and non-*Saccharomyces*) are able to grow in this beverage, providing undesirable characteristics, such as turbidity and sensory changes, which damage the quality of the final product. This fact has motivated a number of research projects aiming at the development of fast and specific methods for the detection of beer spoilage microorganisms. Although the detection of these microorganisms by cultivation in laboratory media does not always provide the required specificity and sensibility, the use of different selective media and incubation conditions still represent the method preferred by breweries. The present article is a literature review about the main beer spoilage microorganisms, including the causes that favour their growth and the methods that can be used for their detection.

PALAVRAS-CHAVE

KEY WORDS

Bebida; Contaminação; Bactérias Gram-positivas;
Bactérias Gram-negativas; Leveduras selvagens.

Beverage; Contamination; Gram-positive bacteria;
Gram-negative bacteria; Wild yeasts.

✉ Autor Correspondente

✉ Corresponding Author

1. INTRODUÇÃO

Durante séculos a cerveja tem sido reconhecida como uma bebida de singular estabilidade microbiológica. De fato, diversos fatores contribuem para que a cerveja seja um meio desfavorável para a multiplicação de vários microrganismos, os quais incluem: a) presença de etanol (0,5 a 10% p/p, equivalente a aproximadamente 0,6 a 12,3% v/v) e de compostos do lúpulo (17 a 55 ppm de iso- α -ácidos); b) elevada concentração de dióxido de carbono (aproximadamente 0,5% p/p); c) baixo valor de pH (3,8 a 4,7) e d) reduzida concentração de oxigênio (<0,1 ppm). Apesar dessas características desfavoráveis, alguns microrganismos ainda conseguem se multiplicar nessas condições e a presença destes (também chamados de microrganismos deteriorantes da cerveja) na cerveja pode causar alterações, tais como aumento da turbidez e desagradáveis mudanças sensoriais, as quais afetam negativamente a qualidade do produto final (SUZUKI et al., 2006a; SAKAMOTO e KONINGS, 2003). Desta forma, os problemas causados pela contaminação da cerveja provocam não somente grandes prejuízos econômicos, com a retirada dos produtos do mercado, mas também perda de confiança do consumidor, estes podem levar à falência da empresa. Por esse motivo, a contaminação da cerveja é uma das principais preocupações das indústrias cervejeiras no mundo inteiro (IJIIMA et al., 2007).

Alguns microrganismos têm sido relatados como deteriorantes da cerveja, incluindo bactérias Gram-positivas e

Gram-negativas e leveduras selvagens. Dentre as bactérias Gram-positivas encontram-se as bactérias ácido lácticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, as quais são consideradas como as mais perigosas nas cervejarias modernas. Dentre as bactérias Gram-negativas encontram-se as dos gêneros *Pectinatus* e *Megasphaera*. Por serem anaeróbias estritas, o risco de contaminação por estes dois gêneros de bactérias tem aumentado com o aumento da produção de cervejas não pasteurizadas e *flash* pasteurizadas, aliado à melhora da tecnologia de engarrafamento, que tem resultado numa significativa redução da concentração de oxigênio no produto final (VAUGHAN et al., 2005; CHIHIB e THOLOZAN, 1999; JESPERSEN e JAKOBSEN, 1996). Com relação às leveduras selvagens, as do gênero *Saccharomyces* destacam-se como as responsáveis pelos maiores problemas de deterioração das cervejas por leveduras, sendo ainda de difícil detecção pelas similaridades que apresentam com as leveduras cervejeiras (BOULTON e QUAIN, 2006; BRIGGS et al., 2004; LEWIS e YOUNG, 1995).

Em uma cervejaria são vários os pontos onde pode ocorrer contaminação microbiana, os quais incluem desde a matéria-prima utilizada até as condições ambientais e o contato humano (BACK, 1994a). A Figura 1 mostra um esquema dos principais pontos de contaminação no processo de elaboração da cerveja. As matérias-primas, tais como malte, lúpulo e água, e os tanques da sala de preparo do mosto (sala de brassagem) são potenciais pontos de contaminação microbiana. As garrafas e barris que retornam do

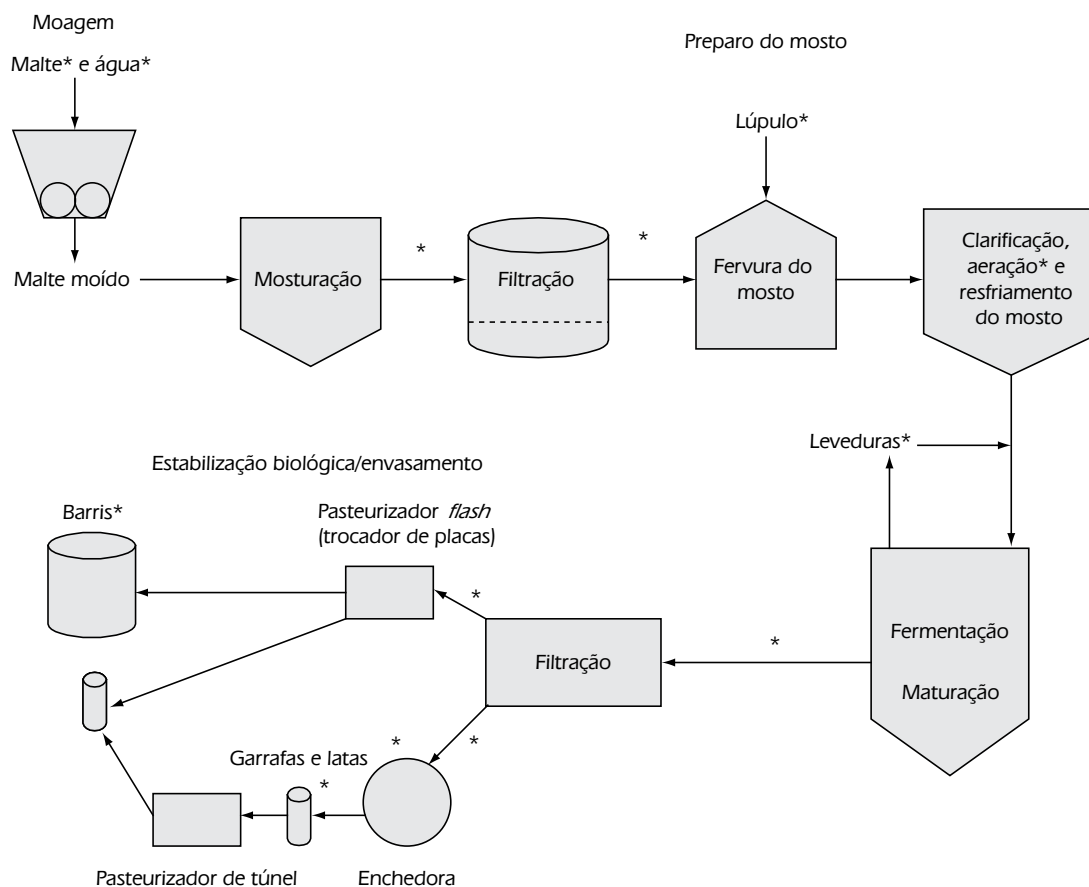


FIGURA 1. Principais pontos de contaminação por microrganismos (*) no processo de elaboração da cerveja (modificado de VAUGHAN et al., 2005).

comércio também podem apresentar elevada contaminação, pois geralmente contêm pequenas quantidades de cerveja onde pode ter ocorrido multiplicação microbiana durante longos períodos de tempo. No entanto, todos os pontos de contato com garrafas limpas ou cheias, porém destampadas, também são possíveis fontes de contaminação. Microrganismos presentes no ar podem contaminar a cerveja na sala de envasamento durante o transporte das garrafas vazias, desde a lavadora de garrafas até a enchedora e a partir da enchedora até o local onde a garrafa é tampada (VAUGHAN et al., 2005).

No mundo todo, consideráveis esforços têm sido realizados para desenvolver métodos de detecção e identificação de microrganismos deteriorantes da cerveja. Contudo, o método mais utilizado na atualidade continua sendo a tradicional incubação em meios de cultura (MARCH et al., 2005). Usualmente, esse método demora uma semana ou mais para que as bactérias formem colônias visíveis nas placas ou para que aumentem a turbidez nos caldos nutritivos. Consequentemente, muitas vezes os produtos são vendidos antes que os resultados microbiológicos estejam disponíveis. No caso de alguma bactéria deteriorante ser detectada e identificada no produto, este precisará ser recolhido do mercado, causando sérios prejuízos comerciais às cervejarias. Por este motivo, as pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de métodos rápidos e específicos para a detecção dos microrganismos contaminantes da cerveja (SAKAMOTO e KONINGS, 2003).

Nos últimos anos, a indústria cervejeira tem presenciado o desenvolvimento de vários métodos rápidos para detecção dos microrganismos deteriorantes da cerveja. Esses métodos incluem técnicas de bioluminescência, técnicas de filtro com epifluorescência direta (DEFT), imunobálises, uso de turbidimetria automatizada, medidas de impedância ou condutância, citometria de fluxo, eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), assim como diversos métodos incluindo tecnologias de DNA, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnicas de hibridação do DNA (PRIEST, 2006; RUSSELL e DOWHANICK, 1999). Entretanto, esses métodos ainda não foram adotados pela maioria das cervejarias por diferentes motivos, principalmente devido à falta de sensibilidade e especificidade, ou à necessidade de custosos equipamentos e reagentes e de pessoal qualificado (HUHTAMELLA et al., 2007).

O presente trabalho mostra uma revisão de literatura sobre os principais microrganismos deteriorantes da cerveja, as causas que favorecem a multiplicação destas espécies e os meios de cultura que podem ser utilizados para detecção destes microrganismos.

2. BACTÉRIAS DETERIORANTES DA CERVEJA

Durante a fermentação do mosto cervejeiro, observa-se que o pH do meio é reduzido de aproximadamente 5,3 para cerca de 4,1, já as concentrações de açúcares, aminoácidos e vitaminas diminuem substancialmente, e a concentração de etanol produzido aumenta até atingir 3,8 a 5,1% (v/v). Estas características fazem da cerveja um meio pouco adequado para o desenvolvimento de bactérias (HOUGH, 1990). Mesmo assim, desde o final do século XIX as bactérias são reconhecidas como importantes agentes de contaminação das cervejas. Uma comparação das descrições das bactérias presentes nas cervejarias e cervejas daquela época com as da atualidade revela que o conjunto de bactérias encontradas permanece praticamente constante, embora alguns nomes tenham mudado no decorrer dos anos. Recentemente, com a utilização de novos processos, em particular o engarrafamento de cervejas

com baixas concentrações de oxigênio, e com o aprimoramento das técnicas microbiológicas, "novos" microrganismos têm sido isolados a partir de cervejas contaminadas (PRIEST, 1996). Felizmente, os microrganismos que são patogênicos para os humanos, tais como *Salmonellae* e *Listeria*, não sobrevivem na cerveja devido às desfavoráveis condições de multiplicação citadas anteriormente (HOLLEROVÁ e KUBIZNIAKOVÁ, 2001). Como resultado disso, o conjunto de microrganismos geralmente encontrado numa cervejaria é relativamente menor quando comparado ao conjunto de microrganismos encontrados nas indústrias farmacêutica, ambiental, de cosméticos ou de alimentos (RUSSELL e DOWHANICK, 1999).

As bactérias encontradas no processo de elaboração da cerveja podem ser classificadas de acordo com sua forma, presença ou não de flagelos, aspectos estruturais e características bioquímicas, ou ainda através de técnicas de coloração (BRIGGS et al., 2004; HOUGH et al., 1982). Dentre estas técnicas, uma das mais importantes e mais amplamente utilizadas em microbiologia é o método de Gram, em que as bactérias são coradas e então classificadas em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas (BOULTON e QUAIN, 2006; PELCZAR et al., 1980). A Tabela 1 lista diversas espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que têm sido encontradas nas cervejarias.

Além da detecção de uma determinada espécie bacteriana no processo de produção de cerveja, é também necessário identificar se esse microrganismo é ou não deteriorante do produto final. Várias cepas bacterianas têm mostrado manter suas viabilidades na cerveja por longos períodos, mas por serem incapazes de se multiplicar no produto não são prejudiciais e não devem ser consideradas como deteriorantes da cerveja (VIZOSO PINTO et al., 2004).

Antes de 1990, o único método disponível para avaliar o potencial de deterioração da cerveja por uma bactéria era o denominado teste forçado (*forcing test*), o qual consistia em reinocular a bactéria na cerveja ou em uma cerveja enriquecida com meio nutriente concentrado. Este teste é pouco prático, pois requer alguns meses para se obter resultados conclusivos. Alguns procedimentos mais rápidos têm sido então desenvolvidos, e atualmente a identificação de uma determinada cepa já pode ser realizada a partir da análise do genoma. Nesses métodos, o genótipo de uma nova cepa detectada é comparado com o genótipo de cada cepa deteriorante da cerveja, este previamente registrado em uma base de dados. Através destas técnicas são obtidas importantes informações (SAKAMOTO e KONINGS, 2003), porém não conclusivas, sendo necessário realizar também o teste forçado.

2.1 Bactérias Gram-positivas

As principais bactérias Gram-positivas causadoras de deterioração da cerveja são as bactérias ácido lácticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* (GIL et al., 2004; VENTURINI FILHO e CEREDA, 2001), as quais são microrganismos imóveis com complexos requerimentos nutricionais e capacidades respiratórias limitadas, sendo sua multiplicação favorecida em condições microaerofílicas e ocasionalmente anaeróbias. A multiplicação de algumas espécies é estimulada pela presença de dióxido de carbono (PRIEST, 2006; HOUGH et al., 1982). Aproximadamente 70% dos problemas por contaminação da cerveja são causados por bactérias ácido lácticas (IIJIMA et al., 2007; SUZUKI et al., 2006a; SUZUKI et al., 2006b).

Em termos do efeito deteriorante causado nas cervejas, sabe-se que as bactérias ácido lácticas causam turbidez, acidez e

odores desagradáveis devido à formação de vários produtos metabólicos. O odor desagradável mais importante associado com as bactérias ácido lácticas é a característica doce, manteigosa ou de mel, fornecida pelo diacetil (2,3-butanodiona) e/ou pela dicetona vicinal relacionada (2,3-pentanodiona). Algumas cepas são capazes ainda de produzir um composto glutinoso, formado por um heteropolímero complexo contendo unidades de glicose, manose e ácidos nucleicos, que tornam a cerveja “viscosa” (BRIGGS et al., 2004; HOUGH et al., 1982).

Nas bactérias ácido lácticas ocorrem duas vias principais de fermentação de hexoses, a homofermentação e a heterofermentação, as quais diferem na maneira de clivagem do esqueleto de 6 carbonos, rendendo diferentes produtos finais (Figura 2). A homofermentação, característica dos *Pediococcus* e de alguns *Lactobacillus*, envolve a clivagem da frutose-1,6-difosfato pela enzima aldolase, formando duas triose-fosfato, que são convertidas em lactato via piruvato. Na heterofermentação, praticada pelos *Leuconostoc* e alguns *Lactobacillus*, ocorre a oxidação da glicose-6-fosfato formando gluconato-6-fosfato, que é descarboxilado a xilulose-5-fosfato. Este composto é posteriormente clivado por uma fosfoctetolase rendendo triose-fosfato e acetil-fosfato. A triose-fosfato é convertida a lactato via piruvato, enquanto que o acetil-fosfato pode ser precursor tanto do etanol quanto do acetato, dependendo do potencial de oxidação – redução do sistema. Portanto, a partir da glicose são formadas quantidades equimolares de CO₂, lactato e etanol ou acetato (PRIEST, 1996).

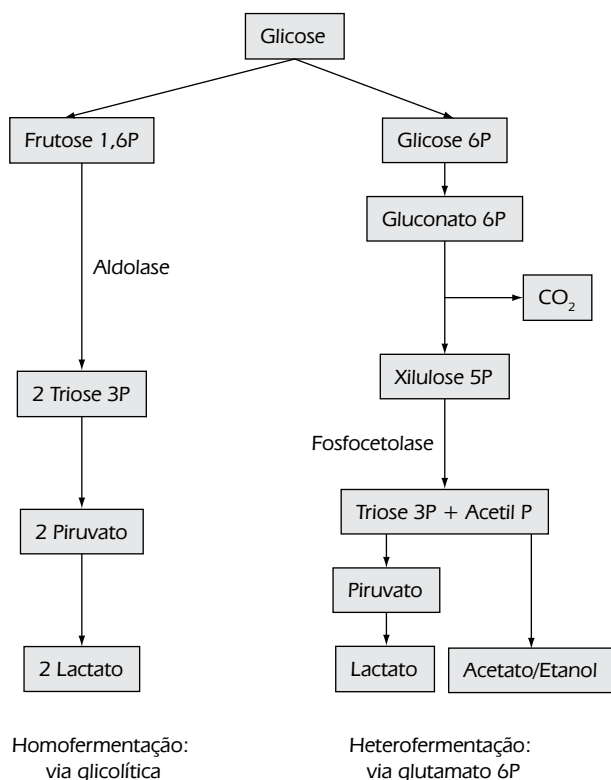


FIGURA 2. Principais vias de fermentação de hexoses nas bactérias ácido lácticas (modificado de PRIEST, 1996).

2.1.1 *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* são microrganismos pleomórficos na aparência, podendo variar sua forma de longos e delgados bacilos até pequenos cocobacilos (STEWART e RUSSELL, 1998). O gênero *Lactobacillus* é o mais abundante das bactérias ácido lácticas, incluindo numerosas espécies que são amplamente empregadas em vários processos fermentativos, tais como na elaboração de vinho, iogurte e pickles (SAKAMOTO e KONINGS, 2003). Apesar de ser possível detectar cepas de pelo menos nove espécies de *Lactobacillus* em cervejas e cervejarias, a visão tradicional de que todos os *Lactobacillus* são organismos deteriorantes é incorreta, pois alguns desses organismos são incapazes de se multiplicar no produto final (PRIEST, 1996).

Lb. brevis é a espécie mais importante de *Lactobacillus* deteriorante da cerveja, uma bactéria heterofermentativa estrita que apresenta um crescimento ótimo a 30 °C e pH entre 4 e 5, e que pode causar superatenuação na cerveja devido à capacidade de fermentar dextrinas e amido (VAUGHAN et al., 2005; PRIEST, 1996). Essa espécie utiliza citrato, piruvato, malato, arginina e tirosina da cerveja como substrato para a produção de ATP (SUZUKI et al., 2005). Algumas cepas deste microrganismo apresentam resistência às substâncias amargas do lúpulo, dentre elas as isohumulonas (iso α -ácidos), o que possibilita sua multiplicação na cerveja (SAKAMOTO et al., 2001). Até alguns anos atrás foi proposto que componentes da parede celular (polissacarídeos e ácidos teicóicos) poderiam atuar como barreiras a essas isohumulonas (YASUI et al., 1995). Mais recentemente, tem sido demonstrada a existência de dois genes, *horA* e *horC*, responsáveis pela resistência das bactérias ácido lácticas aos compostos do lúpulo. O gene *horA* codifica um transportador dependente de ATP que excreta os iso α -ácidos do lúpulo para fora da célula da bactéria. Por outro lado, o produto do gene *horC* confere resistência ao lúpulo, atuando como um transportador dependente da força próton motora. A demonstração desses genes como os mediadores dos mecanismos de resistência ao lúpulo é muito importante, pois seria possível usar esses marcadores genéticos para determinar a capacidade de contaminação da cerveja por qualquer bactéria ácido láctica (IJIMA et al., 2007; SUZUKI et al., 2006a).

O segundo mais importante *Lactobacillus* deteriorante da cerveja é o *Lb. lindneri*, que é responsável por 15 a 25% dos casos de contaminação bacteriana (BACK, 1994b). Este microrganismo é também altamente resistente aos compostos do lúpulo e seu crescimento ótimo ocorre de 19 a 23 °C (BACK et al., 1996). As cepas dessa espécie, encontradas no inóculo de leveduras e durante a fermentação do mosto e maturação da cerveja, são difíceis de serem detectadas com os mesmos meios de cultura utilizados para outras espécies de bactérias ácido lácticas, tal como o MRS ágar (SUZUKI et al., 2006b). De acordo com esses autores, o *Lb. lindneri* cultivado repetidamente em cervejas desgaseificadas torna-se cada vez mais difícil de ser detectado com o meio MRS ágar, à medida que aumenta sua adaptação à cerveja ou quando submetido a tratamento térmico (60 °C por 10 min). Essa espécie constitui, portanto, uma ameaça grave para a indústria cervejeira, pois se ela consegue sobreviver ao processo de pasteurização poderá contaminar a cerveja sem ser detectada com meios de cultura.

Nos últimos anos, algumas novas espécies de *Lactobacillus* descobertas têm sido acrescentadas à lista de microrganismos deteriorantes da cerveja. Dentre essas espécies, o *Lb. paracollinoides*, inicialmente denominado *Lactobacillus* sp. LA2, apresenta elevada

capacidade de deterioração da cerveja, comparável a das cepas de *Lb. brevis* (SUZUKI et al., 2004a). Os microrganismos dessa espécie são capazes de se multiplicar a 15 °C e são heterofermentativos obrigatórios, convertendo 1 mol de glicose em 1 mol de ácido láctico e 1 mol de etanol com produção de gás (CO₂). As células de *Lb. paracollinoides* possuem diâmetro de 0,5 a 1 µm, comprimento de 1,5 a 5 µm e crescem isoladamente ou formando cadeias curtas (SUZUKI et al., 2004b; FUNAHASHI et al., 1998). Outra nova espécie de *Lactobacillus* reconhecida recentemente é o *Lb. backi* (BOHAK et al., 2006). Algumas cepas dessa espécie isoladas do ambiente cervejeiro foram caracterizadas como fortes deteriorantes da cerveja, capazes de se multiplicar no produto final com pH 4,2. As cepas de *Lb. backi* e as de *Lb. paracollinoides* apresentam também os genes *horA* e/ou *horC*, responsáveis pela elevada resistência de algumas bactérias ácido lácticas às substâncias amargas do lúpulo (IIJIMA et al., 2007).

2.1.2 *Pediococcus*

Pediococcus são bactérias homofermentativas que crescem em pares ou tétrades. Originalmente estas bactérias eram conhecidas como sarcinas, pois sua organização de células era confundida com aquela das verdadeiras sarcinas. Por este motivo, a deterioração da cerveja causada por estes microrganismos era denominada “doença da sarcina” (SAKAMOTO e KONINGS, 2003).

Cepas de *Pediococcus* são comuns em cervejarias que praticam baixa fermentação (produção de cervejas tipo *lager*) e pouco frequentes em cervejarias que produzem cervejas de alta fermentação. Isto pode ser consequência de que sua temperatura ótima de crescimento é mais baixa em relação à temperatura ótima de crescimento dos *Lactobacillus*. A deterioração causada por *Pediococcus* é muito similar àquela causada por outras bactérias ácido lácticas, provocando aumento de acidez e turbidez, sabores e aromas desagradáveis (amanteigados, devido à formação de diacetil) (HARTNETT et al., 2002; HOUGH et al., 1982).

P. damnosus é certamente a espécie deteriorante da cerveja mais comum e perigosa, sendo responsável por cerca de 90% dos casos de contaminação de cervejas por *Pediococcus*. Esta bactéria se multiplica bem durante a fermentação, na maturação e no produto acabado, mas raramente no inóculo de leveduras. Em contraste, *P. inopinatus* é frequentemente detectado nas leveduras para inoculação, mas raramente nas outras etapas da fermentação. No entanto, as espécies *P. inopinatus* e *P. dextrinicus* podem se multiplicar na cerveja em presença de baixas concentrações de etanol e de lúpulo e com valores de pH acima de 4,2. Valores mais baixos de pH inibem essas espécies, que também se tornam menos tolerantes ao lúpulo do que *P. damnosus*, o qual é particularmente resistente à ação anti-séptica deste produto (PRIEST, 1996). Estudos recentes demonstraram a presença dos genes *horA* e *horC* em *P. damnosus*, responsáveis pela elevada resistência dessa espécie aos compostos do lúpulo (IIJIMA et al., 2007; SUZUKI et al., 2006a). Uma nova espécie caracterizada recentemente, *P. clausenii*, também provoca deterioração da cerveja (PRIEST, 2006). As bactérias dessa espécie possuem diâmetro de 0,6 a 1 µm e crescem isoladamente, em pares ou em tétrades (DOBSON et al., 2002).

2.1.3 Outras bactérias Gram-positivas

Além das espécies de *Lactobacillus* e *Pediococcus*, uma espécie do gênero *Micrococcus* (*M. kristinae*) também tem sido

relatada como deteriorante da cerveja. Esta bactéria é capaz de se multiplicar em cervejas com baixa concentração de etanol e componentes do lúpulo e com valores de pH acima de 4,5, produzindo um aroma de frutas atípico em cervejas (BACK, 1981). Os *Micrococcus* são usualmente aeróbios estritos, mas *M. kristinae* pode se multiplicar também sob condições anaeróbias (VAUGHAN et al., 2005; SAKAMOTO e KONINGS, 2003).

2.2 Bactérias Gram-negativas

Os microrganismos Gram-negativos deteriorantes da cerveja abrangem diversas espécies de bactérias pertencentes a vários gêneros. Dentre estes, os mais importantes incluem as bactérias dos gêneros *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymomonas* e certos membros da família *Enterobacteriaceae* (Tabela 1).

2.2.1 *Pectinatus*

São bacilos anaeróbios, móveis, não formadores de esporos e com flagelos laterais ligados ao lado côncavo do corpo da célula. Quando as células são jovens elas nadam ativamente, enquanto que as células mais velhas desenvolvem um movimento tipo cobra (LEWIS e YOUNG, 1995; HOUGH et al., 1982). Estas bactérias podem se multiplicar em temperaturas de 15 a 40 °C (ótima de 32 °C), pH 3,5 a 6 (ótimo de 4,5) e em meios contendo até 4,5% p/p (aproximadamente 5,6% v/v) de etanol (CHELAK e INGLEDUEW, 1987).

As espécies do gênero *Pectinatus*, *P. cerevisiophilus* e *P. frisingensis* estão entre as principais bactérias deteriorantes da cerveja, sendo responsáveis por 20 a 30% dos incidentes por contaminação bacteriana, principalmente em cervejas não pasteurizadas (VAUGHAN et al., 2005; BACK, 1994b). Durante a multiplicação destas bactérias são produzidas quantidades consideráveis dos ácidos propiônico, acético, láctico e succínico e também de acetoina (HAIKARA et al., 1981). Em temperaturas acima de 15 °C, *P. cerevisiophilus*, por exemplo, produz uma elevada quantidade dos ácidos propiônico (33 mmol.L⁻¹) e acético (27 mmol.L⁻¹), os quais inibem a multiplicação da levedura cervejeira *S. cerevisiae* (CHOWDHURY et al., 1997). No entanto, o principal efeito de deterioração causado pelas espécies de *Pectinatus* é uma forte turbidez e um repulsivo cheiro de “ovo podre” resultante da combinação de diferentes ácidos graxos, sulfeto de hidrogênio e metil mercaptano (LEE et al., 1980). Nas indústrias cervejeiras já tem sido detectada a presença destas bactérias no esgoto, no óleo de lubrificação misturado com cerveja, em canos com água, no ar e no chão da sala de enchimento, nas enchedoras, na água condensada no teto e na água de maceração do malte antes da moagem (HELANDER et al., 2004). Nos últimos anos foi isolada uma nova espécie de *Pectinatus* associada à deterioração de cervejas, o *P. portalensis*. A cepa B6 dessa espécie, capaz de se multiplicar em cervejas com concentrações de etanol de até 15% v/v, apresenta uma temperatura ótima de crescimento (37 °C) mais elevada e o dobro da velocidade de crescimento quando comparada com *P. cerevisiophilus* e *P. frisingensis* (GONZALEZ et al., 2004).

2.2.2 *Megasphaera*

Megasphaera é uma bactéria do tipo coco Gram-negativo, imóvel e anaeróbia estrita (LEWIS e YOUNG, 1995). Este gênero inclui duas espécies, *M. elsdeni* e *M. cerevisiae*. Porém, somente *M. cerevisiae* tem sido considerada responsável pela deterioração de

TABELA 1. Principais espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas encontradas nas cervejarias (BOULTON e QUAIN, 2006; PRIEST, 2006; BRIGGS et al., 2004; SAKAMOTO e KONINGS, 2003).

Gram-positivas		Gram-negativas	
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i>
			<i>A. liquefaciens</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. brevis</i>		<i>A. pastorianus</i>
	<i>Lb. brevisimilis</i>		<i>A. hansenii</i>
	<i>Lb. buchneri</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>
	<i>Lb. casei</i>		
	<i>Lb. collinoides</i>	<i>Enterobacter (Rahnella)</i>	<i>E. aerogenes</i>
	<i>Lb. coryneformis</i>		<i>E. agglomerans (R. aquatilis)</i>
	<i>Lb. curvatus</i>		<i>E. cloacae</i>
	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>G. oxydans</i>
	<i>Lb. lindneri</i>		
	<i>Lb. malefermentans</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>K. aerogenes</i>
	<i>Lb. parabuchneri</i>		<i>K. pneumoniae</i>
	<i>Lb. paracasei</i>		<i>K. terrigena</i>
	<i>Lb. plantarum</i>		
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>Megasphaera</i>	<i>M. cerevisiae</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>M. kristinae</i>	<i>Obesumbacterium (Hafnia)</i>	<i>O. proteus (H. protea)</i>
	<i>M. varians</i>	<i>Pectinatus</i>	<i>P. cerevisiophilus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. clausenii</i>		<i>P. frisingensis</i>
	<i>P. damnosus</i>		<i>P. sp. DSM20764</i>
	<i>P. dextrinicus</i>		
	<i>P. inopinatus</i>	<i>Selenomonas</i>	<i>S. lactificex</i>
		<i>Zymomonas</i>	<i>Z. mobilis</i>
		<i>Zymophilus</i>	<i>Z. paucivorans</i>
			<i>Z. raffinivorans</i>

cervejas (SAKAMOTO e KONINGS, 2003; SATOKARI et al., 1998). As células de *M. cerevisiae* não formadoras de esporos são cocos levemente alongados de 1,3 a 1,6 µm de diâmetro. Sua multiplicação ocorre entre 15 e 37 °C (ótimo em 28 °C) e em valores de pH acima de 4,1, sendo inibidas em cervejas com uma concentração de etanol acima de 2,8% (p/v) (aproximadamente 3,5% v/v). A contaminação da cerveja causada por esse microrganismo resulta na produção de consideráveis quantidades de ácido butírico, juntamente com baixas concentrações dos ácidos acético, isovalérico, valérico e capróico, e de acetoina. No mosto, são produzidas grandes quantidades de ácidos butírico e capróico, baixas concentrações de ácido acético, isovalérico e valérico, e não ocorre a produção de acetoina (VAN VUUREN, 1996). Semelhante ao *Pectinatus*, a produção de sulfeto de hidrogênio por *M. cerevisiae* provoca odor fecal na cerveja, o que faz dessa bactéria um dos microrganismos mais temidos pelos cervejeiros (LEE, 1994).

2.2.3 Outras bactérias Gram-negativas

Além dos dois gêneros descritos anteriormente, existem também outras bactérias Gram-negativas reconhecidas como causadoras de problemas na indústria cervejeira. *Zymomonas mobilis*, por exemplo, é uma bactéria anaeróbia tolerante ao oxigênio, resistente

ao lúpulo e capaz de se multiplicar em cervejas com pH acima de 3,4 e concentrações de etanol de até 10% (v/v). Sua temperatura ótima de crescimento é 30 °C, mas pode se desenvolver rapidamente a 15 °C nas cervejas mantidas em tonéis (HOUGH et al., 1982).

Outros exemplos de bactérias Gram-negativas deteriorantes das cervejas são as bactérias anaeróbias estritas dos gêneros *Zymophilus* e *Selenomonas*, dentre as quais, duas espécies, *Z. raffinivorans* e *S. lactificex*, já foram isoladas a partir de inóculos de leveduras cervejeiras (VAUGHAN et al., 2005; VAN VUUREN, 1996). Semelhantes a *Pectinatus* spp., as bactérias de *Z. raffinivorans* podem se multiplicar em cervejas com valores de pH acima de 4,3 e concentrações de etanol inferiores a 5% (p/v) (aproximadamente 6,3% v/v). A deterioração causada por esses microrganismos inclui, além da turbidez, a produção dos ácidos propiônico, acético e succínico, metil mercaptano, dimetil sulfeto e sulfeto de hidrogênio (JESPERSEN e JAKOBSEN, 1996).

A indústria cervejeira também tem dado grande atenção às bactérias Gram-negativas aeróbias, principalmente às bactérias ácido acéticas *Gluconobacter* e *Acetobacter*, as quais são capazes de converter etanol em ácido acético, resultando consequentemente em um desagradável odor de vinagre (SAKAMOTO e KONINGS, 2003; JESPERSEN e JAKOBSEN, 1996). Essas bactérias

são resistentes aos compostos amargos do lúpulo, ácidos e etanol, e podem contaminar a cerveja com a presença de ar no espaço vazio (*headspace*) de garrafas e latas, como resultado de envasamento imperfeito (VAUGHAN et al., 2005). Similar atenção tem sido dada às *Enterobacteriaceae*, pois diversas espécies destas bactérias já foram encontradas nas cervejarias, incluindo *Hafnia protea*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter agglomerans*, atualmente reconhecida como *Rahnella aquatilis* (JESPERSEN e JAKOBSEN, 1996). Esses microrganismos têm sido considerados deteriorantes do mosto, uma vez que são incapazes de se desenvolver na cerveja. Dentre estes, as espécies *Hafnia protea* (antigamente chamada *Obesumbacterium proteus*) e *Rahnella aquatilis* têm sido encontradas principalmente no inóculo de leveduras, podendo, portanto, retardar o processo fermentativo. Nas cervejas produzidas a partir de mostos contaminados com *R. aquatilis*, são observados elevados níveis de diacetil ($0,7 \text{ mg.L}^{-1}$) e dimetil sulfeto ($142,8 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$), enquanto que em mostos contaminados com *H. protea* ocorre um aumento das concentrações de dimetil sulfeto, dimetil disulfeto, n-propanol, isobutanol, isopentanol, 2,3-butanodiol e diacetil. Por este motivo, a cerveja produzida utilizando leveduras contaminadas com essa bactéria apresenta odores de ervas ou de frutas (VAUGHAN et al., 2005; VAN VUUREN, 1996).

3. LEVEDURAS SELVAGENS

Qualquer levedura diferente da levedura cervejeira utilizada como inóculo é considerada uma levedura selvagem (MIDDLEKAUFF, 1994). Geralmente as leveduras selvagens são difíceis de serem detectadas e, ao contrário das bactérias, não são susceptíveis à lavagem com ácido, sendo, portanto, impossível erradicá-las do inóculo de leveduras utilizando um tratamento ácido. De fato, a única forma prática de assegurar um inóculo de leveduras livre das leveduras selvagens é a introdução regular de cultivos puros da levedura cervejeira no processo (LEWIS e YOUNG, 1995).

Tradicionalmente, as leveduras selvagens são divididas em *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, sendo as *Saccharomyces* spp. consideradas as mais perigosas (BOULTON e QUAIN, 2006; BRIGGS et al., 2004; JESPERSEN et al., 2000; VAN DER AA KÜHLE e JESPERSEN, 1998). Embora a maioria das *Saccharomyces* selvagens detectadas compreenda as *S. cerevisiae*, outras espécies de *Saccharomyces* também têm sido relatadas, dentre as quais se destacam: *S. diastaticus*, *S. pastorianus*, *S. ellipsoideus* e *S. willianus*. A contaminação com esse tipo de levedura pode causar odores fenólicos à cerveja devido à capacidade destes microrganismos de descarboxilar ácidos fenólicos, tais como os ácidos ferúlico e trans-cinâmico. Outro efeito da contaminação de cervejas com estas leveduras é a superatenuação do produto final, devido à produção e secreção de glucoamilases, permitindo que as leveduras selvagens utilizem as dextrinas, que normalmente não são fermentadas pelas leveduras de cultivo (JESPERSEN e JAKOBSEN, 1996). Algumas cepas de *S. cerevisiae* têm desenvolvido ainda a capacidade de secreção de proteínas (zimocidas), as quais num determinado intervalo de valores de pH são letais para as leveduras de cultivo (PRIEST, 2006; HOUGH et al., 1982). A manutenção do pH baixo, indefinidamente, durante uma fermentação contínua, por exemplo, propicia o desenvolvimento da levedura assassina ("killer"), que pode eliminar completamente a levedura de cultivo e produzir sabor desagradável, descrito como erva-fenólico (VENTURINI FILHO e CEREDA, 2001).

As leveduras selvagens não-*Saccharomyces* incluem diversos gêneros, tais como *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Endomyces*, *Filobasidium*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Torulopsis* e *Zygosaccharomyces* (BARSZCZEWSKI e ROBAK, 2004; VAN DER AA KÜHLE e JESPERSEN, 1998). Algumas destas leveduras apresentam formas diferentes quando comparadas com as leveduras cervejeiras, podendo ser alongadas ou em forma de limão (LEWIS e YOUNG, 1995).

Diversos tipos de deterioração da cerveja podem ser causados pelas leveduras selvagens não-*Saccharomyces*. As leveduras dos gêneros *Debaryomyces* e *Pichia* e algumas espécies de *Candida*, por exemplo, são responsáveis pelo aumento da turbidez, produção de odores anormais descritos como de ésteres (banana e abacaxi) e formação de uma película na superfície da cerveja. Já as leveduras selvagens dos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces*, encontradas na elaboração de cervejas especiais (ale, lambic, porter e Berliner Weisse) e que contribuem com o sabor característico desses produtos, também são consideradas microrganismos deteriorantes de cerveja. Essas leveduras, além de competir com a levedura cervejeira durante a fermentação, conseguem se multiplicar muito bem na cerveja filtrada, proporcionando um desagradável sabor de ácido acético (HAYASHI, et al., 2007).

4. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DOS MICRORGANISMOS DETERIORANTES DA CERVEJA

A detecção dos microrganismos deteriorantes da cerveja normalmente é realizada por cultivo em meios de laboratório. Apesar de esta metodologia nem sempre proporcionar a especificidade e a sensibilidade requeridas, o uso de meios seletivos e condições de incubação ainda é o método preferido pelas cervejarias, sendo amplamente utilizado até os dias atuais.

4.1 Incubação em meios seletivos de cultivo

4.1.1 Meios para a detecção de bactérias

Conforme apresentado na Tabela 2, diversos meios seletivos de cultivo para bactérias deteriorantes da cerveja têm sido desenvolvidos e recomendados por várias organizações cervejeiras. Embora nenhum desses meios seja apropriado para a detecção de todas as cepas de *Lactobacillus* e *Pediococcus*, a combinação de alguns deles tem proporcionado bons resultados (SAKAMOTO e KONINGS, 2003).

A suplementação adicional de nutrientes a estes meios também tem sido uma alternativa interessante, pois possibilita a detecção de um maior número de espécies de microrganismos em menor tempo (GILLET et al., 2003). Alguns exemplos de meios seletivos de cultivo suplementados com nutrientes, utilizados para a detecção dos microrganismos contaminantes da cerveja estão apresentados na Tabela 3.

O emprego do método de detecção baseado no cultivo dos microrganismos em meios seletivos apresenta a desvantagem de ser muito demorado, sendo necessária uma semana ou mais para se obter colônias visíveis nas placas ou visualizar turbidez nos caldos. Conseqüentemente, os produtos são muitas vezes vendidos antes

TABELA 2. Meios seletivos de cultivo recomendados por organizações cervejeiras para a detecção de bactérias deteriorantes da cerveja (SAKAMOTO e KONINGS, 2003).

Meio	Bactéria	Recomendado por ^a
MRS (de Man, Rogosa and Sharpe)	BAL ^b	EBC, ASBC, BCOJ
Raka-Ray	BAL, G(-) ^c	EBC, ASBC, BCOJ
VLB S7-S (Versuchs-und Lehranstalt für Brauerei in Berlin)	BAL	EBC, BCOJ
HLP (Meio Hsu's <i>Lactobacillus</i> e <i>Pediococcus</i>)	BAL	EBC, BCOJ
WLD (Wallerstein Differential)	BAL	EBC, BCOJ
Nakagawa	BAL	EBC, BCOJ
DAS (Schwarz Differential Agar)	BAL	EBC, BCOJ
MRS concentrado	G(-)	EBC, BCOJ
PYF (Peptone, Yeasts extract and Fructose)	G(-)	EBC, BCOJ
Meio Thioglycolate	G(-)	EBC
LL-Agar	G(-)	EBC, BCOJ
UBA (Universal Beer Agar)	BAL, G(-)	EBC, ASBC, BCOJ
NBB (Nachweismedium für bierschädliche Bakteriën)	BAL, G(-)	EBC, BCOJ
Meio Brewer's Tomato Juice	BAL, G(-)	ASBC
LMDA (Lee's Multi-Differential Agar)	BAL	ASBC
BMB (Meio Barney-Miller Brewery)	BAL	ASBC
SMMP (Meio seletivo para <i>Megasphaera</i> e <i>Pectinatus</i>)	G(-)	ASBC, BCOJ

^aEBC, European Brewery Convention; ASBC, American Society of Brewing Chemists; BCOJ, Brewery Convention of Japan.

^bBAL, Bactérias ácido lácticas.

^cG(-), Bactérias Gram-negativas.

TABELA 3. Meios seletivos de cultivo NBB suplementados com nutrientes para detecção de microrganismos contaminantes da cerveja (DÖLHER, 2001).

Tipos de amostra	Método mais recomendado	Detecção
Amostras de levedura	NBB-Boullion (NBB-B)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Pectinatus</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> e <i>Zymomonas</i> .
Inóculo (fermento de carga)		
Cultura pura de levedura		
Recolha (fermento de propagação)		
Sedimentos de levedura		
Cerveja não filtrada	NBB-Concentrado (NBB-C)	Todas as bactérias contaminantes de cerveja, especialmente lactobacilos (<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. lindneri</i> e <i>Lb. brevisimilis</i>), <i>Pediococcus</i> (<i>P. damnosus</i>), <i>Pectinatus</i> e <i>Megasphaera</i> .
Sala de fermentação		Também indicador de germes (<i>Acetobacter</i>).
Cerveja não maturada		
Cerveja de trigo		
Amostras de cerveja filtrada e água	NBB-Ágar (NBB-A)	Todas as bactérias contaminantes de cerveja, especialmente lactobacilos (<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. lindneri</i> e <i>Lb. brevisimilis</i>), <i>Pediococcus</i> (<i>P. damnosus</i>), <i>Pectinatus</i> e <i>Megasphaera</i> .
Água de enxágüe		
Cerveja após filtração		
Cerveja de tanques de pressão		
Cerveja de envasamento		
Cerveja engarrafada		
Chope		
Pontos de contaminação	NBB-Boullion-AM (NBB-B-AM)	Todas as bactérias contaminantes de cerveja.
Produção (exemplos: bombas, linhas de cerveja, juntas de vedação, by-passes e outros)		Germes indicadores: biofilmes.
Área de envasamento (exemplos: envasador, estrelas, válvulas, ajustamentos, lacrador, lavador, inspetor de garrafas)		Microrganismos formadores de muco/placa (<i>Acetobacter</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , etc.).

que os resultados dos testes microbiológicos estejam disponíveis (SAKAMOTO e KONINGS, 2003).

A detecção de *Megasphaera* e *Pectinatus*, por exemplo, pode ser feita utilizando o meio SMMP (Tabela 2), porém, são necessários até 14 dias de incubação, e a detecção é dificultada pelas condições anaeróbias estritas nos seus cultivos (SATOKARI et al., 1998). Outro problema é que esses meios não são específicos para cada espécie. Um exemplo são os meios utilizados para detecção das bactérias deteriorantes ácido lácticas, os quais também permitem a multiplicação de espécies não deteriorantes da cerveja, tais como *Lb. delbrueckii* e *P. acidilactici* (SAKAMOTO e KONINGS, 2003). Conclui-se, portanto, que existe uma grande necessidade de se desenvolver métodos mais rápidos e específicos para a detecção dessas bactérias.

4.1.2 Meios para a detecção de leveduras selvagens

Não existe um único meio de cultivo que permita a detecção de todas as leveduras selvagens sem detectar as leveduras do próprio cultivo. Portanto, o método mais utilizado para a detecção de leveduras selvagens continua sendo a utilização de vários meios seletivos, sendo que a combinação desses meios dependerá do tipo de levedura utilizada (BARSZCZEWSKI e ROBAK, 2004). Para um uso geral, a combinação de MYGP ("Malt extract, Yeast extract, Glucose, Peptone agar") com 200 ppm de CuSO_4 , um meio não seletivo incubado a 37 °C durante 4 dias, e XMACS (meio contendo xilose, manitol, adonitol, celobiose e sorbitol), meio lisina ou meio CLEN (contendo cadaverina, lisina, etilamina e nitrato) pode ser capaz de detectar a maioria das leveduras selvagens *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* nas cervejarias que produzem cervejas tipo *lager*. Vale a pena lembrar que todos os meios propostos para a detecção das leveduras selvagens estão baseados em princípios seletivos, por isso é importante ter em mente que a inibição das leveduras de cultivo e a multiplicação das selvagens serão influenciadas pelas condições fisiológicas das leveduras, pela concentração celular e pelas condições de incubação (JESPERSEN e JAKOBSEN, 1996).

4.2 Métodos rápidos de detecção de microrganismos

Nas últimas duas décadas, têm sido testados vários métodos rápidos para a detecção e identificação dos microrganismos deteriorantes da cerveja. Alguns deles encontram-se disponíveis comercialmente, e outros ainda estão em fase de pesquisa (PRIEST, 2006; HAMMOND et al., 1999). Porém, a maioria desses métodos tem sido desenvolvida para aplicações clínicas. Um dos grandes obstáculos em aplicar qualquer método desenvolvido para um laboratório clínico na indústria cervejeira é contornar as diferenças fundamentais na multiplicação dos isolados clínicos comparados aos contaminantes da cerveja (BARNEY e KOT, 1992). Enquanto um teste para a detecção rápida de uma espécie clínica como *Escherichia coli*, com tempo médio de geração de 20 a 30 min, pode requerer apenas algumas horas, o mesmo teste rápido para bactérias lácticas, como *P. damnosus* ou *Lb. lindneri*, com tempos médios de geração superiores a 5 h, pode requerer um período mínimo de vários dias, dependendo do teste. Portanto, a detecção "rápida" deve ser sempre considerada no contexto das velocidades de crescimento dos microrganismos em questão, quando comparada ao método de detecção tradicional (DOWHANICK, 1995).

Dentre os principais métodos rápidos aplicados para a detecção dos microrganismos deteriorantes da cerveja destacam-se:

- **Impedância/condutância:** Mede as mudanças de impedância ou condutância elétrica em um meio de cultivo como resposta à multiplicação dos microrganismos (BARNEY e KOT, 1992). As principais vantagens no uso desta tecnologia são: a redução no tempo de detecção em comparação com o método de incubação em meios de cultivo, dependendo do meio empregado, a elevada seletividade para a multiplicação microbiana e a elevada automação para avaliar um grande número de amostras. As desvantagens incluem custos elevados de equipamentos e operação, e nem todos os meios são apropriados para serem utilizados com este método (DOWHANICK, 1995).
- **Bioluminescência:** Mede a concentração de adenosina trifosfato (ATP) por meio de uma reação química que produz luz. Os níveis de ATP podem ser diretamente correlacionados ao número de microrganismos presentes. Porém, tem sido relatado que a concentração de ATP varia amplamente entre diferentes espécies, assim como para uma mesma espécie em diferentes estados fisiológicos. Além disso, as células de leveduras contêm cerca de 100 vezes mais ATP do que as células das bactérias, o que dificulta a extrapolação do número de microrganismos contaminantes (BRIGGS et al., 2004).
- **Microscopia de epifluorescência direta (DEFT):** Baseia-se em procedimentos de coloração fluorescente para a detecção de células microbianas, utilizando um microscópio fluorescente. O método requer a concentração da amostra por filtração em membrana, a coloração e a contagem das colônias (BOULTON e QUAIN, 2006). Uma das grandes desvantagens deste método é que se torna muito trabalhoso quando se deseja analisar várias amostras (BARNEY e KOT, 1992).
- **Citometria de fluxo:** Utiliza tecnologia laser e métodos de coloração para a detecção de microrganismos em líquidos escoando através de um pequeno orifício (BARNEY e KOT, 1992). A principal vantagem deste método é sua sensibilidade. Porém, requer longos tempos para processar grandes volumes de amostra, e pequenas partículas podem interferir no resultado (DOWHANICK, 1995).
- **Reação em cadeia da polimerase (PCR):** É uma das mais novas e promissoras técnicas e que permite rápida detecção dos microrganismos contaminantes da cerveja (RUSSELL e DOWHANICK, 1999). Baseia-se na duplicação de seqüências de ácido desoxirribonucleico (DNA) por meio de uma reação exponencial em cadeia para produzir quantidades detectáveis deste ácido. Utilizando essa técnica, tem sido possível detectar baixas concentrações ($\leq 10 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) de *Pectinatus* spp. e *M. cerevisiae* após 2 a 4 dias e 2 a 3 dias, respectivamente. Por outro lado, esses mesmos microrganismos são detectados em até 14 dias quando incubados em meio SMMP, enquanto que utilizando o teste forçado (*forcing test*) a contaminação com *Pectinatus* e *Megasphaera* spp. pode ser detectada em 2 a 3 ou 3 a 4 semanas, respectivamente (JUVONEN et al., 1999). A técnica de PCR permite a detecção de *Lb. brevis*, *Lb. lindneri*, *P. damnosus*, *Pectinatus* spp., *Megasphaera* spp. e *Selenomonas* spp. (PRIEST, 2006 SATOKARI, et al., 1997). Também tem sido possível diferenciar leveduras cervejeiras de não cervejeiras utilizando essa técnica (YAMAGISHI et al., 1999).

5. CONCLUSÃO

Nas cervejarias modernas, o risco de contaminação da cerveja por microrganismos está associado principalmente à multiplicação de cepas específicas de *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. Porém, o grupo das bactérias Gram-negativas anaeróbias estritas vem adquirindo uma importância crescente devido ao aperfeiçoamento das técnicas de manipulação e engarrafamento da cerveja, que tem reduzido significativamente o conteúdo de oxigênio no produto final, e também devido ao aumento da produção de cervejas com baixas concentrações de etanol e de lúpulo. Apesar de os principais riscos de contaminação da cerveja estarem relacionados à presença de bactérias, as leveduras selvagens, em particular *Saccharomyces* spp., também representam uma importante preocupação para as cervejarias. No entanto, a capacidade de se multiplicar na cerveja varia de acordo com cada cepa, para uma mesma espécie de microrganismo deteriorante.

A detecção destes microrganismos deteriorantes da cerveja também não é um procedimento tão simples, pois muitos destes microrganismos parecem adaptados à cerveja e algumas vezes apresentam dificuldades para se multiplicar em outros meios, incluindo os de laboratório. Mesmo assim, o método mais comumente utilizado nas cervejarias para a detecção dos microrganismos contaminantes da cerveja continua sendo a tradicional incubação em meios de cultura. Entretanto, devido à diversidade dos microrganismos, diferentes meios devem ser utilizados a fim de garantir a detecção das bactérias deteriorantes Gram-positivas e Gram-negativas, assim como das leveduras selvagens *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. Apesar disso, a maior preocupação nos dias de hoje ainda é quanto à elaboração de métodos mais sensíveis, específicos e rápidos para detecção destes microrganismos contaminantes. Tais métodos são urgentemente necessários para poder prever o potencial de deterioração da cerveja, de uma forma rápida e eficiente, diminuindo desta forma o risco da venda de um produto contaminado, e auxiliando as cervejarias a encontrar e controlar os principais pontos em seus processos onde podem ocorrer contaminação microbiana. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é atualmente uma técnica promissora que permite uma detecção rápida dos microrganismos deteriorantes da cerveja.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências de fomento CAPES, FAPESP e CNPq.

REFERÊNCIAS

- BACK, W. Beer spoilage bacteria: taxonomy of beer spoilage bacteria: gram positive species. *Monatsschrift für Brauerei*, Berlin, v. 34, p. 267-276, 1981.
- BACK, W. *Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie. Teil 1*. Nürnberg: Verlag Hans Carl, 1994a. 165 p.
- BACK, W. Secondary contamination in the filling area. *Brauwelt International*, Nürnberg, v. 4, p. 326-328, 1994b.
- BACK, W.; BOHAK, I.; EHRMANN, M.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Revival of the species *Lactobacillus lindneri* and the design of a species specific oligonucleotide probe. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v. 19, n. 3, p. 322-325, 1996.
- BARNEY, M.; KOT, E. A comparison of rapid microbiological methods for detecting beer spoilage microorganisms. *MBAA Technical Quarterly*, Madison, v. 29, n. 3, p. 91-95, 1992.
- BARSZCZEWSKI, W.; ROBAK, M. Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. *Food Microbiology*, London, v. 21, n. 2, p. 227-231, 2004.
- BOHAK, I.; THELEN, K.; BEIMFOHR, C. Description of *Lactobacillus backi* sp. nov., an obligate beer-spoiling bacterium. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, Nürnberg, v. 59, n. 3/4, p. 78-82, 2006.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. *Brewing Yeast & Fermentation*. London: Blackwell Publishing, 2006. p. 510-585.
- BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. *Brewing: Science and Practice*. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 606-649.
- CHELAK, B. J.; INGLEDEW, W. M. Anaerobic Gram-negative bacteria in brewing – a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, St. Paul, v. 45, p. 123-127, 1987.
- CHIHIB, N. E.; THOLOZAN, J. L. Effect of rapid cooling and acidic pH on cellular homeostasis of *Pectinatus frisingensis*, a strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 191-202, 1999.
- CHOWDHURY, I.; WATIER, D.; LEGUERINEL, I.; HORNEZ, J. P. Effect of *Pectinatus cerevisiiphilus* on *Saccharomyces cerevisiae* concerning its growth and alcohol production in wort medium. *Food Microbiology*, London, v. 14, n. 3, p. 265-272, 1997.
- DOBSON, C. M.; DENEER, P. H.; LEE, S.; HEMMINGSEN, S.; GLAZE, S.; ZIOLA, B. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus claussenii* sp. a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 52, n. 6, p. 2003-2010, 2002.
- DÖHLER. *NBB e suas aplicações*. Elaborado por Steffen Amon. Disponível em: <<http://www.dohler.com>>. Acesso em: 5 set. 2001.
- DOWHANICK, T. M. Advances in yeast and contaminant determination: the future of the so called "rapid" methods. *Cerevisia – Belgian Journal of Brewing and Biotechnology*, Bruxelles, v. 20, n. 4, p. 40-50, 1995.
- FUNAHASHI, W.; SUZUKI, K.; OHTAKE, Y.; YAMASHITA, H. Two novel beer-spoilage *Lactobacillus* species isolated from breweries. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, St. Paul, v. 56, n. 2, p. 64-69, 1998.
- GIL, G.; del MÓNACO, S.; CERRUTTI, P.; GALVAGNO, M. Selective antimicrobial activity of chitosan on beer spoilage bacteria and brewing yeast. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 26, n. 7, p. 569-574, 2004.
- GILLET, A.; DUPUCHE, M. H.; VELINGS, N. Supplementation to the MRS medium for the cultivation of fastidious beer spoilage bacteria. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, Nürnberg, v. 56, n. 1-2, p. 10-14, 2003.
- GONZALEZ, J. M.; JURADO, V.; LAIZ, L.; ZIMMERMANN, J.; HERMOSIN, B.; SAIZ-JIMENEZ, C. *Pectinatus portalensis* nov. sp., a relatively fast-growing, coccoidal, novel *Pectinatus* species isolated from a wastewater treatment plant. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 86, n. 3, p. 241-248, 2004.
- HAIKARA, A.; PENTTILÄ, L.; ENARI, T. M.; LOUNATMAA, K. Microbiological, biochemical, and electron microscopic characterization of a *Pectinatus* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 41, n. 2, p. 511-517, 1981.

HAMMOND, J.; BRENNAN, M.; PRICE, A. The control of microbial spoilage of beer. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 105, n. 2, p. 113-120, 1999.

HARTNETT, D. J.; VAUGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from raw barley and sorghum. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 108, n. 2, p. 169-177, 2002.

HAYASHI, N.; ARAI, R.; TADA, S.; TAGUCHI, H.; OGAWA, Y. Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 7-8, p. 778-785, 2007.

HELANDER, I. M.; HAIKARA, A.; SADOVSKAYA, I.; VINOGRADOV, E.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus* – lipopolysaccharides of a Gram-positive genus. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 28, n. 5, p. 543-552, 2004.

HOLLEROVÁ, I.; KUBIZNIAKOVÁ, P. Monitoring gram positive bacterial contamination in Czech breweries. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 107, n. 6, p. 355-358, 2001.

HOUGH, J. S. **Biología de la Cerveza y de la Malta**. Zaragoza: Acribia, 1990. 194 p.

HOUGH, J. S.; BRIGGS, D. E.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W. **Malting and Brewing Science: volume II hopped wort and beer**. 2 ed. London: Chapman e Hall, 1982. p. 389-914.

HUHTAMELLA, S.; LEINONEN, M.; NIEMINEN, T.; FAHNERT, B.; MYLLYKOSKI, L.; BREITENSTEIN, A.; NEUBAUER, P. RNA-based sandwich hybridisation method for detection of lactic acid bacteria in brewery samples. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 543-553, 2007.

IJIMA, K.; SUZUKI, K.; ASANO, S.; KURIYAMA, H.; KITAGAWA, Y. Isolation and identification of potential beer-spoilage *Pediococcus inopinatus* and beer-spoilage *Lactobacillus backi* strains carrying the *horA* and *horC* gene clusters. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 113, n. 1, p. 96-101, 2007.

JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 139-155, 1996.

JESPERSEN, L.; van der AA KÜHLE, A.; PETERSEN, K. M. Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 43-53, 2000.

JUVONEN, R.; SATOKARI, R. Detection of spoilage bacteria in beer by polymerase chain reaction. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, St. Paul, v. 57, n. 3, p. 99-103, 1999.

LEE, S. Y.; MABEE, M. S.; JANGAARD, N. O.; HORIUCHI, E. K. *Pectinatus*, a new genus of bacteria capable of growth in hopped beer. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 86, p. 28-30, 1980.

LEE, S. Y. SMMP – a medium for selective isolation for *Megasphaera* and *Pectinatus* from the brewery. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, St. Paul, v. 52, n. 3, p. 115-119, 1994.

LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing**. London: Chapman e Hall, 1995. 260 p.

MARCH, C.; MANCLUS, J. J.; ABAD, A.; NAVARRO, A.; MONTOYA, A. Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic

acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 303, n. 1-2, p. 92-104, 2005.

MIDDLEKAUFF, J. E. Microbiological aspects. In: HARDWICK, W. A. **Handbook of Brewing**. New York: Marcel Dekker, 1994. v. 2. p. 480-499.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. 566 p.

PRIEST, F. G. Gram-positive brewery bacteria. In: PRIEST, F. G.; CAMPBELL, I. (Ed.). **Brewing Microbiology**. 2 ed. London: Chapman e Hall, 1996. p. 127-161.

PRIEST, F. G. Microbiology and microbiological control in the brewery. In: PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. (Ed.). **Handbook of Brewing**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 607-627.

RUSSELL, I.; DOWHANICK, T. M. Rapid detection of microbial spoilage. In: PRIEST, F. G.; CAMPBELL, I. (Ed.). **Brewing Microbiology**. 2 ed. London: Chapman e Hall, 1999. p. 209-235.

SAKAMOTO, K.; MARGOLLES, A.; VAN VEEN, H. W.; KONINGS, W. N. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter *horA*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 18, p. 5371-5375, 2001.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 105-124, 2003.

SATOKARI, R.; JUVONEN, R.; VON WRIGHT, A.; HAIKARA, A. Detection of *Pectinatus* beer spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 12, p. 1571-1573, 1997.

SATOKARI, R.; JUVONEN, R.; MALLISON, K.; VON WRIGHT, A.; HAIKARA, A. Detection of beer spoilage bacteria *Megasphaera* and *Pectinatus* by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 119-127, 1998.

STEWART, G. G.; RUSSELL, I. **An Introduction to Brewing Science e Technology: series III: brewer's yeast**. London: The Institute of Brewing, 1998. 108 p.

SUZUKI, K.; KOYANAGI, M.; YAMASHITA, H. Genetic characterization and specific detection of beer-spoilage *Lactobacillus* sp. LA2 and related strains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 677-683, 2004a.

SUZUKI, K.; FUNAHASHI, W.; KOYANAGI, M.; YAMASHITA, H. *Lactobacillus paracollinoides* sp. nov., isolated from brewery environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 1, p. 115-117, 2004b.

SUZUKI, K.; IJIMA, K.; OZAKI, K.; YAMASHITA, H. Study on ATP production of lactic acid bacteria in beer and development of a rapid pre-screening method for beer-spoilage bacteria. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 111, n. 3, p. 328-335, 2005.

SUZUKI, K.; IJIMA, K.; SAKAMOTO, K.; SAMI, M.; YAMASHITA, H. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 112, n. 2, p. 173-191, 2006a.

SUZUKI, K.; IJIMA, K.; ASANO, S.; KURIYAMA, H.; KITAGAWA, Y. Induction of viable but nonculturable state in beer spoilage lactic

acid bacteria. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 112, n. 4, p. 295-301, 2006b.

VAN DER AA KÜHLE, A.; JESPERSEN, L. Detection and identification of wild yeast in lager breweries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 205-213, 1998.

VAN VUUREN, H. J. J. Gram-negative spoilage bacteria. In: PRIEST, F. G.; CAMPBELL, I. (Ed.). **Brewing Microbiology**. 2 ed. London: Chapman e Hall, 1996. p. 163-191.

VAUGHAN, A.; O'SULLIVAN, T.; VAN SINDEREN, D. Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 111, n. 4, p. 355-371, 2005.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: LIMA, U. A. et al. **Biotechnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 91-144. v. 4.

VIZOSO PINTO, M. G.; PASTERIS, S. E.; STRASSER DE SAAD, A. M. Glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from beer. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 1, p. 111-118, 2004.

YAMAGISHI, H.; OTSUTA, Y.; FUNAHASHI, W.; OGATA, T.; SAKAI, K. Differentiation between brewing and non-brewing yeasts using a combination of PCR and RFLP. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 3, p. 505-513, 1999.

YASUI, T.; YODA, K.; KAMIYA, T. Analysis of S-layer proteins of *Lactobacillus brevis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 133, n. 1-2, p. 181-186, 1995.